

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 03-219875

(43)Date of publication of application : 27.09.1991

(51)Int.Cl. C12N 15/12
 C07K 13/00
 C12N 1/19
 C12N 15/81
 C12P 21/02
 //(C12N 1/19
 C12R 1:865)
 (C12N 15/81
 C12R 1:645
 C12R 1:19)
 (C12P 21/02
 C12R 1:865)

(21)Application number : 02-015559

(71)Applicant : CHEMO SERO THERAPEUT RES
 INST
 KOWA CO

(22)Date of filing : 25.01.1990

(72)Inventor : NAKAO JUNJI
 SUGAWARA KEISHIN
 MIYATSU YOSHINOBU
 HAMADA FUKUSABURO
 IWASAKI AKIO
 SUDA MAKOTO

(54) PRODUCTION OF CPB-I AND RECOMBINANT PLASMID AND TRANSFORMED YEAST USING THEREFOR

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide the subject plasmid which is a shuttle vector having a gene originated from yeast and a gene originated from E.coli plasmid, containing a specific anticoagulant substance (CPB-1) manifestation gene fragment and capable of producing CPB-1 in high efficiency.

CONSTITUTION: The above recombinant plasmid is constructed of a shuttle vector having the above genes and has a CPB-1 manifestation gene fragment composed of Pho5 promoter, CPB-1-cDNA and GAP-DH terminator. The CPB-1-cDNA has been cloned by the present inventor and the details are disclosed in the specification of Japanese Patent Laid-Open Sho 64-20095. The CPB-1-cDNA is a gene fragment having a size of 1566bp and containing a gene fragment coding a peptide (CPB-1) consisting of 319 amino acids. It has been ascertained that the CPB-1 structure gene coded by the gene fragment codes the amino acid sequence of table 1.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japan Patent Office

⑫ 公開特許公報(A) 平3-219875

⑪ Int.Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成3年(1991)9月27日

C 12 N 15/12
C 07 K 13/008619-4H
8717-4B

C 12 N 15/00

A※

審査請求 未請求 請求項の数 6 (全11頁)

⑭ 発明の名称 CPB-Iの製造方法並びにこれに用いる組換えプラスミドおよび形質転換酵母

⑯ 特 願 平2-15559

⑰ 出 願 平2(1990)1月25日

⑱ 発 明 者 中 尾 順 二 熊本県熊本市清水町麻生田1795-4

⑲ 発 明 者 菅 原 敬 信 熊本県熊本市武蔵ヶ丘2-142

⑳ 発 明 者 宮 津 嘉 信 熊本県熊本市健軍2丁目12-23

㉑ 発 明 者 濱 田 福 三 郎 熊本県菊地郡西合志町須屋2679-2

㉒ 出 願 人 財団法人化学及血清療法研究所 熊本県熊本市清水町大窪668番地

㉓ 出 願 人 興 和 株 式 会 社 愛知県名古屋市中区錦3丁目6番29号

㉔ 代 理 人 弁理士 有賀 三幸 外2名

最終頁に続く

明 細 書

発明の名称

CPB-Iの製造方法並びにこれに用いる組換えプラスミドおよび形質転換酵母

特許請求の範囲

① 酵母由来の遺伝子と大腸菌プラスミド由来の遺伝子を有するシャトルベクターであって、さらにPho5プロモーター、CPB-I-cDNAおよびGAP-DHターミネーターからなるCPB-I発現遺伝子断片を有することを特徴とする組換えプラスミド。

② 酵母由来の遺伝子が、2 μ ori、arsIおよび形質転換酵母用選択マーカー遺伝子を有するものである請求項(1)記載の組換えプラスミド。

③ 大腸菌由来の遺伝子が、プラスミドpBR322由来のoriおよび薬剤耐性遺伝子を有するものである請求項(1)記載の組換えプラスミド。

④ 請求項(1)記載の組換えプラスミドを酵母に導入することにより得られる形質転換酵母。

⑤ 宿主酵母が、Saccharomyces cerevisiaeである

請求項(4)記載の形質転換酵母。

(6) 請求項(4)または(5)記載の形質転換酵母を培養し、該培養物よりCPB-Iを採取することを特徴とするCPB-Iの製造方法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、ヒト胎盤を始めとするヒト組織より得られる抗血液凝固物質(カルフォビンゲン、以下CPB-Iと称する)の遺伝子組換えによる製造方法、ならびにこれに用いる組換えプラスミドおよび形質転換酵母に関する。

〔従来の技術〕

これまでに、生体関連の抗血液凝固物質として、ヘパリン、ヘパリンコファクターII、アンチトロンビンIII、 α I-アンチトリプシン等が知られている。これまでのところ、抗血液凝固剤として実用化されたのはヘパリンのみであるが、副作用の問題や、使用方法が限定されていること等から満足のいくものではなかった。

このような状況の下で、本出願人は、ヒト胎盤

からCPB-I (当初PCIと称していた) を分離精製することに成、特許出願した (特開昭62-174023号)。さらに、本出願人は、CPB-I に対して特異的なモノクローナル抗体を作製し、(特開昭63-123395号)、その後この抗体をプローブとしてヒト胎盤cDNAライブラリーからCPB-Iをコードする遺伝子断片をクローニングし、これを遺伝子組換え技術により大腸菌で発現することに成功した (特開昭64-20095号)。

このようにして大腸菌により発現・精製されたCPB-Iは、胎盤より精製された本来のCPB-Iとはほぼ同等の抗血液凝固活性を有することが確認された。しかしながら、この場合に発現の宿主となっている大腸菌は、発熱物質 (バイロジェン) を特に多く産生することが知られており、目的のCPB-Iの精製において、このようなバイロジェン等の除去操作が煩雑になることが危惧された。

また、一般に、特定の外来遺伝子を遺伝子組換え技術により発現させる場合は、発現の宿主細胞

として何を用いるか、発現用プロモーターとして何を用いるかによって、目的のペプチドの発現量は大きく変化することが知られている。これまでの様々な遺伝子組換えによる外来遺伝子の発現に関する報告により、一般的に効率のよい発現系というものが次第に明らかにされつつある。しかしながら、目的の外来遺伝子の発現産物が発現の宿主細胞に及ぼす影響等により、通常発現量が高いとされている発現系が、特定の外来遺伝子の発現には好ましい結果を示さないことがあることが判ってきた。これとは逆に、特定の外来遺伝子に対しては非常に相性がよく、極めて高い量の発現が可能となるような発現系が存在することも知られている。

したがって、CPB-Iの工業的生産を目的として研究を進めるうえでは、より効率よくしかも安定にCPB-Iを生産することが可能なCPB-Iの生産に適した発現系を見いだすことが望まれている。

〔発明の目的〕

このような状況において、本発明者らは、CPB-Iの遺伝子組換えによる製造に関して研究を重ねた結果、酵母を宿主としてしかも特定の発現系を用いることにより、所望する生理活性を有するCPB-Iを極めて効率よくしかも安定に産生する形質転換酵母を得ることに成功し、CPB-Iの効率的な製造方法を見いだして本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明の目的は抗血液凝固物質CPB-Iを遺伝子組換え技術を用いて製造する際において、CPB-Iを極めて効率よく産生させるための酵母用組換えプラスミドおよび形質転換酵母ならびにこれを用いたCPB-Iの製造方法を提供することにある。

〔発明の構成および効果〕

かかる目的を達成する本発明組換えプラスミドの構成は、酵母由来の遺伝子と大腸菌プラスミド由来の遺伝子を有するシャトルベクターであって、さらにPho5プロモーター、CPB-I-cDNAおよびGAP-DHターミネーターか

らなるCPB-I発現遺伝子断片を有することを特徴とするものである。

本発明において、遺伝子組換え技術により発現させる遺伝子：CPB-I-cDNAについては本発明者らにより先にクローニングされており、詳細は、特開昭64-20095号公報に記載されている。

このCPB-I-cDNAは、アミノ酸319個からなるペプチド (CPB-I) をコードする遺伝子断片を含む1566bpの遺伝子断片である。これにコードされるCPB-I構造遺伝子は、下記のアミノ酸配列をコードしていることが確認されている。

Met Ala Gln Val Leu Arg Gly Thr Val Thr Asp
Phe Pro Gly Phe Asp Glu Arg Ala Asp Ala Glu
Thr Leu Arg Lys Ala Met Lys Gly Leu Gly Thr
Asp Glu Glu Ser Ile Leu Thr Leu Leu Thr Ser
Arg Ser Asn Ala Gln Arg Gln Glu Ile Ser Ala
Ala Phe Lys Thr Leu Phe Gly Arg Asp Leu Leu
Asp Asp Leu Lys Ser Glu Leu Thr Gly Lys Phe
Glu Lys Leu Ile Val Ala Leu Met Lys Pro Ser

Arg. Leu Tyr Asp Ala Tyr Glu Leu Lys His Ala
 Leu Lys Gly Ala Gly Thy Asn Glu Lys Val Leu
 Thr Glu Ile Ile Ala Ser Arg Thr Pro Glu Glu
 Leu Arg Ala Ile Lys Gln Val Tyr Glu Glu Glu
 Tyr Gly Ser Ser Leu Glu Asp Asp Val Val Gly
 Asp Thr Ser Gly Tyr Tyr Gln Arg Met Leu Val
 Val Leu Leu Gln Ala Asn Arg Asp Pro Asp Ala
 Gly Ile Asp Glu Ala Gln Val Glu Gln Asp Ala
 Gln Ala Leu Phe Gln Ala Gly Glu Leu Lys Trp
 Gly Thr Asp Glu Glu Lys Phe Ile Thr Ile Phe
 Gly Thr Arg Ser Val Ser His Leu Arg Lys Val
 Phe Asp Lys Tyr Met Thr Ile Ser Gly Phe Gln
 Ile Glu Glu Thr Ile Asp Arg Glu Thr Ser Gly
 Asn Leu Glu Gln Leu Leu Leu Ala Val Val Lys
 Ser Ile Arg Ser Ile Pro Ala Tyr Leu Ala Glu
 Thr Leu Tyr Tyr Ala Met Lys Gly Ala Gly Thr
 Asp Asp His Thr Leu Ile Arg Val Met Val Ser
 Arg Ser Glu Ile Asp Leu Phe Asn Ile Arg Lys
 Glu Phe Arg Lys Asn Phe Ala Thr Ser Leu Tyr
 Ser Met Ile Lys Gly Asp Thr Ser Gly Asp Tyr

TAT GGC TCA AGC CTG GAA GAT GAC GTG GTG GGG
 GAC ACT TCA GGG TAC TAC CAG CGG ATG TTG GTG
 GTT CTC CTT CAG GCT AAC AGA GAC CCT GAT GCT
 GGA ATT GAT GAA GCT CAA GTT GAA CAA GAT GCT
 CAG GCT TTA TTT CAG GCT GGA GAA CTT AAA TGG
 GGG ACA GAT GAA GAA AAG TTT ATC ACC ATC TTT
 GGA ACA CGA AGT GTG TCT CAT TTG AGA AAG GTG
 TTT GAC AAG TAC ATG ACT ATA TCA GGA TTT CAA
 ATT GAG GAA ACC ATT GAC CGC GAG ACT TCT GGC
 AAT TTA GAG CAA CTA CTC CTT GCT GTT GTG AAA
 TCT ATT CGA AGT ATA CCT GCC TAC CTT GCA GAG
 ACC CTC TAT TAT GCT ATG AAG GGA GCT GGG ACA
 GAT GAT CAT ACC CTC ATC AGA GTC ATG GTT TCC
 AGG AGT GAG ATT GAT CTG TTT AAC ATC AGG AAG
 GAG TTT AGG AAG AAT TTT GCC ACC TCT CTT TAT
 TCC ATG ATT AAG GGA GAT ACA TCT GGG GAC TAT
 AAG AAA GCT CTT CTG CTG CTC TGT GGA GAA GAT
 GAC TAA

これまでに報告されている酵母の発現系で用い
 られたプロモーターとしては、ADH1（アルコ

Lys Lys Ala Leu u Leu Leu Cys Gly Glu Asp
 Asp

従って、本発明におけるC P B - I 発現プラス
 ミドの構築には、上記のアミノ酸配列をコードす
 る遺伝子断片が使用される。C P B - I をコード
 する遺伝子断片の具体的な塩基配列としては、そ
 の一例として下記の塩基配列からなるDNAを含
 む遺伝子断片が挙げられる。

ATG GCA CAG GTT CTC AGA GGC ACT GTG ACT GAC
 TTC CCT GGA TTT GAT GAG CGG GCT GAT GCA GAA
 ACT CTT CGG AAG GCT ATG AAA GGC TTG GGC ACA
 GAT GAG GAG AGC ATC CTG ACT CTG TTG ACA TCC
 CGA AGT AAT GCT CAG CGC CAG GAA ATC TCT GCA
 GCT TTT AAG ACT CTG TTT GGC AGG GAT CTT CTG
 GAT GAC CTG AAA TCA GAA CTA ACT GGA AAA TTT
 GAA AAA TTA ATT GTG GCT CTG ATG AAA CCC TCT
 CGG CTT TAT GAT GCT TAT GAA CTG AAA CAT GCC
 TTG AAG GGA GCT GGA ACA AAT GAA AAA GTA CTG
 ACA GAA ATT ATT GCT TCA AGG ACA CCT GAA GAA
 CTG AGA GCC ATC AAA CAA GTT TAT GAA GAA GAA

ールデヒドロゲナーゼ) プロモーター [Hetzeman
 ら、Nature, Vol. 293, p717-722(1981)]、
 P h o 5 (抑制性酸性フォスファターゼ) プロモ
 ーター [宮之原ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA,
 Vol. 80, p1-5 (1983)]、P G K 1 (フォスフォ
 グルコキナーゼ) プロモーター [Hitzman ら、
 Science, Vol. 219, p620-625(1983)]、G A P -
 D H (グリセロールアルデハイドフォスフェートデヒ
 ドロゲナーゼ) プロモーター [Bitterら、Gene,
 Vol. 32, p264-274 (1983)] 等が挙げられる。こ
 こに挙げた酵母用プロモーターの中では、特
 にG A P - D H プロモーターが、プロモーター活
 性が強く、その結果効率よく外来遺伝子を発現す
 ることが知られている。

本発明に係るC P B - I の発現においては、
 G A P - D H プロモーターを用いた発現系は発現
 量の面ではかなりよい結果が得られたものの、形
 質転換体の継代による発現の安定性という一面に
 おいて問題が残ることが確認された。

そのために、種々のプロモーターとの組み合わせ

により、種々のC P B 発現系を構築し、得られた形質転換体によるC P B - I の発現量と継代による発現の安定性の両面から検討を進めたところ、前記本発明プラスミドを用いた発現系によりC P B - I を発現させた場合が非常によい結果を示すことが確認された。

すなわち、本発明に係る酵母発現系においては、P h o 5 プロモーターおよびG A P - D H ターミナーを用いることを特徴とし、酵母と大腸菌の遺伝子を有するシャトルベクターが使用される。特に、酵母由来遺伝子として、2 μ ori および arsI の2つのorigin並びに選択マーカー遺伝子を用いるのが好ましい。

この酵母用選択マーカー遺伝子としては、種々のアミノ酸を産生する遺伝子、例えばロイシン産生遺伝子、ヒスチジン産生遺伝子、トリプトファン産生遺伝子等が用いられる。このようなアミノ酸産生選択マーカー遺伝子を用いる場合には、形質転換を行う宿主酵母として、該アミノ酸要求性のものを使用する。

より構築される。両遺伝子の結合は、常法により行われるが、合成リンカー等を使用することにより、端の制限酵素認識部位（制限酵素による切口）が異なる2つのDNA断片を結合させることが可能となる。このような合成リンカーは、市販のものを使用することもできるし、目的に応じてDNA合成機により調製することもできる。

このようなC P B - I 発現プラスミドを常法により宿主となる酵母菌に導入することにより、本発明のC P B - I 発現形質転換酵母が得られる。代表的な酵母の形質転換方法としては、酵母をプロトプラスト化してプラスミドを導入する方法〔Hinnenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 75, p1929(1978)〕、アルカリ金属による酵母の形質転換方法〔木村ら、J. Bacteriol., Vol. 153, p163(1983)〕等が挙げられる。

宿主酵母の代表例としては、*Saccharomyces cerevisiae* AH22 [a leu2 his4 Can1]（微生物第312号）等が挙げられる。宿主酵母は、発現用プラスミドに用いた酵母選択マーカー遺伝

一方、菌由来遺伝子としては、大腸菌内でプラスミドの自律増殖を可能にするoriginおよび大腸菌内で機能する選択マーカー遺伝子が用いられる。この大腸菌用選択マーカーとしては、種々の薬剤耐性遺伝子、例えばアンピシリン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子等が使用される。このようなoriginと薬剤耐性遺伝子の双方を有する大腸菌由来遺伝子断片として、例えば大腸菌プラスミドpBR322由来の遺伝子断片を使用することが可能である。

このような外来遺伝子発現用シャトルベクターの一例として、第2図に示すシャトルベクターpPS1が挙げられる。このシャトルベクターはP h o 5 プロモーターとG A P ターミナーの間に、外来遺伝子の組み込み部位として、XhoI およびBamHI 部位を有する。

本発明のC P B - I 発現プラスミドは、このようなシャトルベクターの外来遺伝子用形質発現調節部位にC P B - I - c D N A を組み込むことに

子に適したものが使用される。また、通常の宿主酵母では、P h o 5 プロモーターはリン酸の存在下においてプロモーター活性が抑制されることから、リン酸存在下においても、P h o 5 プロモーター活性を抑制しないように改良された酵母宿主細胞を使用することも可能である。そのような酵母としては、*Saccharomyces cerevisiae* AH22 pho80（微生物第509号）が挙げられる。このような改良株を用いれば、リン酸の存在下においてもP h o 5 プロモーターは機能が抑制されず、C P B - I を発現させることが可能となる。

通常の酵母宿主、すなわちリン酸存在下においてはP h o 5 プロモーターの機能を抑制する酵母を用いた形質転換体では、最初にリン酸を含む培地で酵母を対数増殖期まで増殖した後、これを遠心により集菌して、次にリン酸を含まない培地中で培養することにより、所望の菌体数まで増殖した酵母にP h o 5 プロモーターを機能させ、C P B - I を一挙に発現させることができる。

また、培地としては、酵母の選択マーカーが活

4)

かされる培地を使用する。例えば、上記の *Saccharomyces cerevisiae* AH22 [a leu2 his4 Can1] を用いた場合には、該宿主酵母菌がロイシン、ヒスチジン要求株であり、そのいずれかのアミノ酸が組換えプラスミドにより補充される場合には、もう片方の欠損するアミノ酸を含む合成培地、例えばバルクホルダー最小培地〔東江ら、J. Bacteriol., 113, p727-738、P.R. Burkholder, Am. J. Bot., 30, p206(1943)〕が使用される。

単位培地当りの菌体数を増加させて、C P B-I の発現量を向上させるためには、上記のような選択性合成培地の代わりに、半合成培地と呼ばれる酵母エキスを含む栄養分の高い培地を使用することができる。通常、このような非選択性の培地を用いると菌体数は増加するものの、プラスミドを脱落させた酵母菌も増殖し、結果的に発現量は低下することが多いが、本発明の形質転換体では、そのような現象は確認されず、非選択性の培地においても選択性培地の場合と同等の発現量を示す。

大量培養の際には、段階的な培養により酵母菌

数を増殖させる。まず数リットルの規模で選択性の培地を用いて培養し、次にこれを栄養豊富な半合成培地により数十～数百リットルの規模で培養することができる。

このようなC P B-I の製造方法によれば、酵母菌体破砕液中に含まれる最も多い蛋白質としてC P B-I を発現させることが出来、後の精製においても極めて効率的に目的のC P B-I を精製することが可能となる。

C P B-I の精製方法としては、通常の精製手段を応用することにより、きわめて効率よくC P B-I を精製することができる。

このようにして得られた酵母由来C P B-I のアミノ末端の解析を行ったところ、胎盤から精製されたC P B-I と同様、アミノ末端がアセチル化を受けていることが確認された。このことから、本発明方法により製造されたC P B-I の生理活性が天然のものと比較して何等劣るものではないことが推測される。

本発明は、このような性状的に優れたC P B-I

を、形質転換酵母により極めて大量に発現させることを可能にするものであり、特に工業的レベルでのC P B-I の製造において、きわめて優れた技術を提供するものである。

以下、実施例により本発明を更に詳細に説明する。

実施例

(1) C P B-I 遺伝子の調製

ヒト胎盤cDNAライブラリーより、フェージを用いたクローニングを行い、抗C P B-I マウスモノクローナル抗体を用いて発現産物のスクリーニングを行った。その結果、1566 bpにわたるほぼ完全長のcDNAを得ることができ、この遺伝子断片には、アミノ酸319個からなるC P B-I をコードする遺伝子を含むことが確認された(第1図参照)。C P B-I のcDNAのクローニングに関しては、特開昭64-20095号公報にさらに詳細に記載されている。

(2) 酵母用シャトルベクターp P S I の調製

外来遺伝子発現用のプロモーターとして酸性フ

ォスファターゼ(Pho5)のプロモーターを有する酵母-大腸菌シャトルベクターpAM82(特開昭59-36699号)を、制限酵素XhoIおよびPvuIIで処理し、これを2%アガロースゲル電気泳動に処することにより、Pho5プロモーター他を含む約9.8kbpの遺伝子断片を得た。

一方、GAP-DH遺伝子のHindIII断片〔J. Biol. Chem., Vol. 255, No. 6, p2596-2605(1980)〕をpBR322のHindIII部位に組み込んだプラスミドpBR-GAPを、制限酵素SalIおよびEcoRVで処理し、GAPターミネーターを含む遺伝子断片(SalI-EcoRVフラグメント)を得た。この遺伝子断片をクローニングベクターpUC19のSalI-SmaI部位に組み込み、GAPターミネーターを有するプラスミドpUC-GAPterとした。このプラスミドを制限酵素SalIで処理して開裂させた後、DNAポリメラーゼ(クレノウフラグメント)により切口をフィルインし、これにBamHIリンカーを導入して再度環状化した。次にこのプラスミドを制限酵素

PstIで処理し、上記様にDNAポリメラーゼで反応させた後、XhoIリンカーを導入した。これによりGAPターミネーターのすぐ上流にBamHI部位とXhoI部位が導入されたプラスミドpUC-GAPter (BamHI, XhoI)を得た。このプラスミドを制限酵素RsaIで処理し、アガロース電気泳動によりGAPターミネーターを含む約1.4kbpの遺伝子断片を得た。これをさらに制限酵素XhoIで処理した後、上記と同様の操作を行い、GAPターミネーターを含むRsaI-XhoIフラグメントを得た。

この遺伝子と上記で調製したpAM82由来のXhoI-PvuIIフラグメントを、T4 DNAリガーゼを用いて結合させることにより、酵母-大腸菌シャトルベクターpPS1を得た。このシャトルベクターは、外来遺伝子用の発現調節遺伝子としてPho5プロモーターおよびGAPターミネーターを有し、さらに酵母-大腸菌シャトルベクターとして機能するために、酵母由来遺伝子としてarsI、2 μ oriおよびロイシン産生遺伝子

することにより、第3図にリンカーAとして示す合成リンカーを得た。このリンカーは、制限酵素XhoIとNcoIで切断された切口の異なる2つのDNA断片を結合させるものであり、リンカー全体としての塩基配列は、Pho5プロモーターの機能低下を防ぐべく、本来Pho5プロモーターのリーディング配列のDNA配列と極めて近い配列になるようにデザインされている。

さらにDNA3とDNA4を混合してアニーリングすることにより、第3図にリンカーBとして示す合成リンカーを得た。この合成リンカーは、制限酵素SacIとBamHIで切断された2つのDNA断片を結合させるものであり、その途中のDNA配列には制限酵素HindIIIおよびXhoIの制限酵素認識配列を有する。

CPB-I-cDNA NcoI-SacI遺伝子断片、合成リンカーA、合成リンカーBおよびシャトルベクターpPS1を、制限酵素XhoIおよびBamHIで処理することにより得られた4種の遺伝子断片を混合し、T4 DNAリガーゼにて反応さ

(Leu2)を腸菌由来の遺伝子としてアンピシリン耐性遺伝子およびpBR322のoriginを有する外来遺伝子高発現用ベクターである(第2図参照)。

(3) CPB-I発現プラスミドの構築

上記(1)で得られたCPB-I-cDNAを制限酵素NcoIおよびSacIで処理し、CPB-Iの全構造遺伝子を含むNcoI-SacI断片を得た(第1図参照)。

このCPB-I-cDNA NcoI-SacI断片を上記シャトルベクターpPS1のXhoI-BamHI部位に組み込むために、第3図に示した2種の異なる合成リンカーを下記の通り作製した。DNA合成機(アプライドバイオシステムズ381A)を用いて下記の4種のDNAを合成した。

DNA1: TCGAGTAGAGCAAGCAAATTCGAGATTACC

DNA2: CATCTCGTTCGTTTAAGCTCTAATGGGTAC

DNA3: AAGCTTCTCGAG

DNA4: TCGATTCTGAAGAGCTCCTAG

上記DNA1とDNA2を混合しアニーリング

せた。

この反応液を、フェノール処理、エタノール沈殿させたのち、これを用いて大腸菌HB101コンピテント細胞の形質転換を行った。得られた形質転換クロンのプラスミドDNAを回収し、適当な制限酵素で処理して、アガロースゲル電気泳動からの切断パターンを分析することにより、シャトルベクターpPS1のXhoI、BamHI部位にCPB-I-cDNA NcoI-SacI断片が組み込まれた所望のCPB-I発現プラスミドpAPCPB-I(第4図参照)を持つ大腸菌クロンを得た。このクロンから常法に従いプラスミドpAPCPB-Iを調製した。

(4) CPB-Iを発現する形質転換酵母の調製

宿主酵母としてサッカロマイセス・セレビシエAH22 Pho80(微工研発第508号)を用い、これをYPD培地(2%ポリペプトン、1%イーストエキス、2%グルコース)100mlに接種し、30℃で5-7 $\times 10^6$ まで培養した後、遠心して集菌し洗浄した後、1mlのリチウム溶液に懸濁

6)

した。30℃で1時間振とうし、その10分の1 (100 μ l) に約2 μ gの組換えDNA (プラスミドpAPCPB-1) を加えて30℃で30分間振とうした。これに0.7mlのポリエチレングリコール溶液を加え、30℃で90分間静置した。2℃で5分間熱処理後、滅菌水で2回洗浄した。0.1mlの最小培地 (0.7% イーストニトロゲンベータアミノ酸、2% グルコース、20 μ g/ml ヒスチジン、2% 寒天) に細胞を懸濁させ同最小培地プレートに塗布した。30℃で培養してロイシン非要求性のコロニーを得た。このコロニーを20 μ g/ml ヒスチジンを含むバルクホルダーミニマム培地にて培養し、形質転換酵母サッカロマイセス・ヒレビスエpAPCPB-1を得た。

(6) 酵母によるCPB-Iの発現

上記形質転換酵母を30℃で3日間振とう培養し、遠心 (3500 rpm、5分間) により酵母菌体を集めた後、1/10培養液量の溶菌液 (25mM EDTA-25mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.4)) に懸濁し、ガラスビーズを加えミキシングすることにより酵

母菌を洗浄した後、OPD溶液を酵素基質溶液として100 μ lずつ添加する。暗所にて25℃30分間反応させた後、4.5M H₂SO₄を50 μ lずつ添加し、キサーで混合して反応を停止させる。これを492nmの吸光度を測定し、CPB-I標準品の吸光度から検量線を求め、各検体のCPB-I量を定量する。

その結果、1lの酵母培養液から約150mgのCPB-Iが得られていることが確認された。また、この結果と酵母破砕液中の総可溶性蛋白質を測定した結果とから、本発明においては総可溶性蛋白質のうち約40%もの割合でCPB-Iを得ることが可能であることが判明した。

次に、この酵母破砕液をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により解析した。すなわち、10%ポリアクリルアミドゲルにより検体を電気泳動し、これをコマーシーブリアントブルー (CBB) にて染色した。その結果、他の酵母由来の蛋白質のバンドと比較して、きわめて大量であることを示すCPB-I (分子量約34,000) の

母菌に物理的衝撃を加えて酵母菌を破砕した。これを遠心して、ガラスビーズおよび酵母破砕断片を除去し、遠心上清を得た。

この上清について、抗CPB-Iモノクローナル抗体を用いたELISAによりCPB-Iの活性を測定した。このELISAは、下記の操作からなる。

まず、ポリスチレン製96穴ELISA用マイクロプレートに、一次抗体として抗CPB-Iマウスモノクローナル抗体をコーティング用緩衝液 (0.05M炭酸ナトリウム緩衝液 (pH9.6)) で10 μ g/mlに希釈し、各ウェルに100 μ lずつ注入する。25℃で2時間静置し、PBS-Tween (PBS 1lに対してTween20を0.5ml溶解する) で洗浄した後、各ウェルにCPB-I標準溶液および検体を100 μ lずつ注入し、25℃一夜反応させる。その後PBS-Tweenにて洗浄した後、西洋ワサビ・パーオキシダーゼ標識Fab'抗CPB-I抗体をPBS-Tweenで希釈して各ウェルに100 μ lずつ注入し、25℃2時間以上反応させる。3回

バンドが確認された。その結果の模式図を第5図に示す。

(6) 工業的規模の大量培養によるCPB-Iの生産

前記(4)で得られた形質転換酵母を、最小培地にて30℃、2lのスケールで培養した。次いでこれを30lの最小培地に接種し、30℃71時間培養した。これを170lの半合成培地 (培地1l中にショ糖40g、酵母エキス5g、硫酸アンモニウム5g、硫酸マグネシウム・7水和物0.5g、消泡剤としてポリオキシエチレンポリオキシプロピレンエーテル0.025ml) にて30℃、24時間培養した。最終培養後の酵母菌体に存在するCPB-Iの量を前記ELISAにて測定したところ、選択能力のない半合成培地においても、選択合成培地 (最小培地) での発現量と同等のCPB-Iの存在を確認した。

このことは、本形質転換株が継代培養においてもきわめて発現の安定性がよいことを示している。

さらに、発現量についても前記(4)の小スケールでの発現実験において得られた発現量と同等のレ

ベルでC P B-Iの発現維持されていることが確認された。

(7) C P B-Iの大量精製

上記で大量培養した培養液より0.1μmのメンブランフィルターを用いて粗換え酵母菌を集菌し、フレンチプレス型細胞破砕機により物理的刺激を加えて酵母菌を破砕した。その後、濾過を行い、得られた粗抽出液を限外濾過器により濃縮した。これに酢酸を加えて等電点沈殿(pH4.5)を行った後、生成した沈殿物を遠心により除去し、上清をアンモニアによりpHを7.0に調整し、次いでQAE-トヨパール550C(トーソー社製)を用いる陰イオン交換クロマトグラフィーに供した。すなわち、70mM塩化ナトリウムを含む10mMリン酸緩衝液(pH7.4)で平衡化したカラムに粗抽出液をアブライシ、同緩衝液で洗浄後、300mM塩化ナトリウムを含む10mMリン酸緩衝液(pH7.4)で溶出した。得られたC P B-Iを含む画分を限外濾過器により濃縮した後、10mM塩化ナトリウムを含む10mMリン酸緩衝液(pH7.4)で平衡化し

300オングストローム(直径10mm×長さ250mm, 半井化学社製)を用い、溶離液として0.1%トリフルオロ酢酸溶液及び0.1%トリフルオロ酢酸を含む80%アセトニトリル溶液を用いて直線濃度勾配により流速1ml/分で溶出した。

検出は214nmの紫外吸収により行った。得られた各ペプチドについてピコタグアミノ酸分析装置(ミリポアリミテッド社製)によりアミノ酸組成分析を行い、N末端ペプチドを含む画分を同定した。このN末端ペプチドは、アルギニンとグルタミン酸、アラニン、バリン、ロイシンの5個のアミノ酸から構成されていることを確認した。

次いでアミノ酸配列解析を行った結果、N末端アミノ基はブロックされていた。更に、FAB-MASS分析装置(日本電子社製JMS-0300)により分析した結果、分子量は627であった。

以上の結果からN末端はアセチル化されており、以下の配列を有すると判断した。

Acetyl-Ala-Gln-Val-Leu-Arg

(8) 胎盤抽出C P B-Iとの抗血液凝固活性の比

たTSKG3000カラム(トーソー社製)によりゲル濾過を行った。その後C P B-Iを含む画分を、再度70mM塩化ナトリウムを含む10mMリン酸緩衝液(pH7.4)で平衡化したQAEトヨパール550Cにアブライシ、洗浄後、70mMより300mMまでの塩化ナトリウムの直線濃度勾配で溶出し、精製C P B-Iを得た。

(9) 酵母により産生されたC P B-Iの物性

(A) N末端アミノ酸配列分析:

酵母由来C P B-I 5.6mgを、6Mグアニジンを含む0.2Mトリス塩酸緩衝液(pH8.2)に溶解し、ジチオスレイトール5mgを加え、室温で30分間反応させた後、ヨード酢酸50mgを加え室温で30分間反応させてS-カルボキシメチルC P B-Iを得た。

これを2M尿素を含む20mMトリス塩酸緩衝液(pH7.4)に溶解し、トリプシン100μgを加えて37℃、24時間消化させた後、逆相クロマトグラフィーによりペプチドの分離を行った。

クロマトカラムとしてコスモシル5C18

較

本発明酵母由来C P B-Iとヒト胎盤由来C P B-Iの抗血液凝固活性を比較した。すなわち、0.5mg/mlのPT試薬(リオプラスチン, 持田製薬社製)100μlおよび各種濃度の試料100μlを混和し、3分後に生理食塩水で2倍に希釈した標準液200μlを添加し血液凝固時間を測定した。

酵母由来C P B-Iとヒト胎盤由来C P B-Iの抗血液凝固作用を比較した表1から判るように本発明酵母由来C P B-Iとヒト胎盤由来C P B-Iとは、ほぼ同じ血液凝固時間(PT)の延長効果を示した。

以下余白

表 1

添加試料 (% / 反溶液)	血液凝固時間 (秒)	
	酵母由来 CPB-1	ヒト胎盤由来 CPB-1
0	28	29
1	88	79
2	125	119
5	170	165
7	191	192

図面の簡単な説明

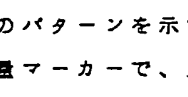
第1図は、先に出願人よりクローニングされたCpB-1-cDNAの全塩基配列を示す図である。翻訳開始コドンATGのAを1番目として番号を付した。

第 2 図は、本発明に用いたシャトルベクター
P S 1 の構造を示す図である。

第3図は、プラスミドpAPCPB-Iの構築の際に使用した合成リンカーの構造を示す図である。

第4図は、本発明のCPB-I発現プラスミド
APCPB-Iの構造を示す図である。

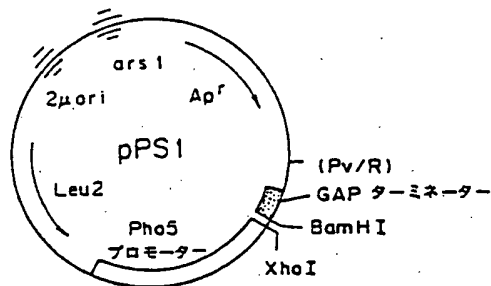
第 5 図は、本発明の形質転換体による C P B -

I の発現を示す、 破砕液のポリアクリルアミドゲル電気泳動のパターンを示す模式図である。レーン 1 は分子量マーカーで、上から 200 K、97 K、68 K、43 K、29 K、18.4 K、14.3 K ダルトンを示す。レーン 2 ~ 4 は、本発明の CPB-I 産生形質転換体破砕液の泳動パターンである。レーン 5 は、本発明のプラスミドを有さない宿主酵母菌の破砕液の泳動パターンである（陰性対照）。

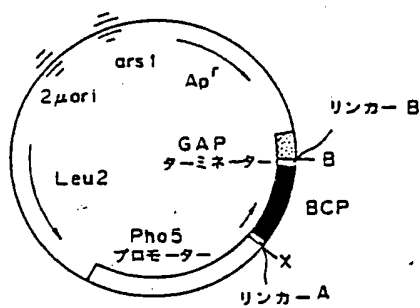
以上

[illegible]

第 2 図



第 3 図



第 4 図

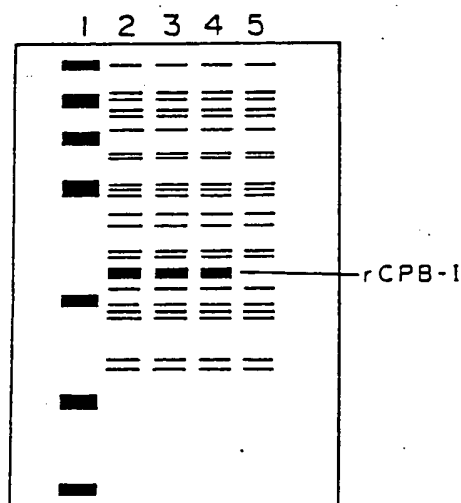
リンカー A

TCGAGTAGAGCAAGCAAATTCGAGATTACC
CATCTCGTTTCGTTTAAGCTCTAATGGGTA
XhoI Pho5 leader

リンカー B

XhoI
AAGCTTCTCGAG
TCGATTCTGAAGAGCTCCTAG
SacI HindIII BamHI

第 5 図



5 (10)

第1頁の続き

⑨Int. Cl. 5

識別記号

庁内整理番号

C 12 N 1/19
 15/81
 C 12 P 21/02
 ZNA C 8214-4B
 C 12 N 1/19
 C 12 R 1:865
 C 12 N 15/81
 C 12 R 1:645
 8515-4B
 C 12 R 1:19
 C 12 P 21/02
 C 12 R 1:865

⑩発明者 岩崎 昭夫
 ⑪発明者 須田 誠

千葉県松戸市常盤平1-14-1 長谷川レジデンス302号
 東京都東村山市野口町2-17-43 興和東村山荘206号

手続補正書(自発)

6. 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の欄

平成2年12月4日

7. 補正の内容

(1) 明細書中、第7頁、第2行

「Thy」とあるを「Thr」と訂正する。

特許庁長官 植松 敏 殿

送

1. 事件の表示

平成2年特許願第15559号

2. 発明の名称

CPB-Iの製造方法並びにこれに用いる組換えプラスミドおよび
 形質転換酵母

3. 補正をする者

事件との関係 出願人

名称 財団法人 化学及血清療法研究所

名称 興和株式会社

4. 代理人

住所 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号(〒103)

共同ビル 電話(669)0904(代)

氏名 (6870) 弁理士 有賀 三幸

住所 同上

氏名 (7756) 弁理士 高野 登志雄

住所 同上

氏名 (9673) 弁理士 中嶋 俊夫

補正命令の日付

自 発